

illumina®

MiniSeq System

Denature and Dilute Libraries Guide

ILLUMINA PROPRIETARY

文書番号：1000000002697 v09 JPN

2021年4月

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。

本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上を使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づきいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

本文書に記載された製品の適切かつ安全な使用を徹底するため、資格を有した、適切なトレーニングを受けた担当者が、本文書の指示を厳密かつ明確に遵守しなければなりません。当該製品の使用に先立ち、本文書のすべての内容を熟読し、理解する必要があるものとします。

本文書に含まれるすべての説明を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があり、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、または、顧客による当該製品の取得に関連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

改訂履歴

文書番号	日付	変更内容
文書番号： 1000000002697 v09	2021年 4月	ローディング濃度情報を明確化し、標準キットと Rapid キットの両方の情報が含まれるよう更新。
文書番号： 1000000002697 v08	2020年 9月	ローディング濃度情報に Rapid キットが含まれるよう更新。
文書番号： 1000000002697 v07	2019年 2月	プロトコール C の推奨される最終ローディング濃度の表を単一の推奨濃度範囲に置き換え。
文書番号： 1000000002697 v06	2018年 11月	プロトコール D の AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel のプーリング率を修正。
文書番号： 1000000002697 v05	2018年 11月	プロトコール C の AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel のプーリング率を修正。 AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Research Assay Panel のプーリング率を追加。
文書番号： 1000000002697 v04	2018年 10月	AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを用いて調製されたライブラリーを変性および希釈するためのプロトコール D を追加。
文書番号： 1000000002697 v03	2018年 7月	AmpliSeq Myeloid Panel for Illumina のプーリング率を追加。
文書番号： 1000000002697 v02	2018年 5月	プロトコール C での PhiX の使用に関する警告を削除。

文書番号	日付	変更内容
文書番号： 1000000002697 v01	2018 年 4 月	AmpliSeq for Illumina パネルを変性および希釈するためのプロトコール C を追加。
文書番号： 1000000002697 v00	2016 年 1 月	初版リリース。

目次

改訂履歴.....	iii
概要	1
ローディング量と濃度.....	1
プロトコルの種類.....	1
ベストプラクティス.....	2
消耗品および機器.....	2
消耗品.....	2
機器.....	2
プロトコール A：標準的なノーマライゼーション法.....	3
試薬の調製.....	3
ノーマライズされたライブラリープールの調製.....	3
ライブラリーを 1 nM に希釈.....	4
ライブラリーの変性.....	4
ライブラリーをローディング濃度に希釈.....	5
プロトコール B：ビーズベースのノーマライゼーション法.....	5
HT1 の準備.....	5
インキュベーターの準備.....	6
ライブラリーをローディング濃度に希釈.....	6
希釈済みライブラリーの変性.....	6
プロトコール C：AmpliSeq for Illumina パネルのノーマライゼーション法.....	6
試薬の調製.....	7
ライブラリーの希釈.....	7
ライブラリーのプーリング.....	7
ライブラリーの変性.....	8
20 pM への変性済みライブラリーの希釈.....	8
最終ローディング濃度へのライブラリーの希釈.....	8
プロトコール D：AmpliSeq Library Equalizer for Illumina のノーマライゼーション法.....	9
試薬の調製.....	9
ライブラリーのプーリング.....	9
ライブラリーの変性.....	10
変性済みライブラリーの希釈.....	10
最終ローディング濃度へのライブラリーの希釈.....	10

PhiX コントロールの変性と希釈	11
4 nM への PhiX の希釈.....	11
PhiX の変性.....	11
変性済み PhiX のローディング濃度への希釈	11
ライブラリーと PhiX コントロールの混合	12
次の手順.....	12
トラブルシューティングラン用の PhiX の調製	12
4 nM への PhiX の希釈.....	12
PhiX の変性.....	13
変性済み PhiX ライブラリーのローディング濃度への希釈.....	13

概要

このガイドでは、Illumina® MiniSeq™システムでのシーケンス用に調製されたライブラリーを変性および希釈する手順について説明します。

次の目的で PhiX ライブラリーを調製するための手順が含まれています。

- **コントロール用**：シーケンスコントロールとして使用するために、PhiX ライブラリーを調製して、調製済みライブラリーと混合する場合があります。11 ページの「PhiX コントロールの変性と希釈」を参照してください。
- **トラブルシューティング用**：トラブルシューティングを目的として、PhiX のみのシーケンスランのために PhiX ライブラリーを調製する場合があります。12 ページの「トラブルシューティングラン用の PhiX の調製」を参照してください。

ローディング量と濃度

この手順では、ライブラリーを変性および希釈することにより、標準キットの場合は 1.4 pM、Rapid キットの場合は 1.6 pM の推奨濃度で 500 µL の最終ローディング量が得られます。実際には、ローディング濃度はライブラリー調製および定量方法によって変わる場合があります。

プロトコールの種類

ライブラリー調製の際に用いた手法に応じた、適切な変性および希釈プロトコールに従ってください。

- **標準的なノーマライゼーション**：ライブラリー調製の文書で推奨されている標準的なライブラリー定量と品質管理の手順を用いてノーマライズされたライブラリーの場合。これらのライブラリーについては、**プロトコール A** に従ってください。3 ページの「プロトコール A：標準的なノーマライゼーション法」を参照してください。
- **ビーズベースのノーマライゼーション**：ライブラリー調製の文書に記載されているビーズベースのノーマライゼーションをサポートする方法に示された、ビーズベースの手順を用いてノーマライズされたライブラリーの場合。これらのライブラリーについては、**プロトコール B** に従ってください。5 ページの「プロトコール B：ビーズベースのノーマライゼーション法」を参照してください。
- **AmpliSeq™ for Illumina のノーマライゼーション**：標準的な AmpliSeq for Illumina ワークフローを用いて調製されたすべてのライブラリーについては、**プロトコール C** に従ってください。6 ページの「プロトコール C：AmpliSeq for Illumina パネルのノーマライゼーション法」を参照してください。
- **AmpliSeq Library Equalizer™ for Illumina のノーマライゼーション**：AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを用いて調製されたすべてのライブラリーについては、**プロトコール D** に従ってください。9 ページの「プロトコール D：AmpliSeq Library Equalizer for Illumina のノーマライゼーション法」を参照してください。

ベストプラクティス

- クラスター形成用のライブラリーを変性させる場合は、NaOH を新しく希釈して、**必ず**、12.5 より高い pH に調製してください。変性プロセスの過程において、この手順が不可欠です。
- 少ない液量のピペティングにより生じるエラーで最終 NaOH 濃度に影響を与えないよう、新しく希釈した NaOH を 1 mL 以上調製します。
- 最良の結果を得るため、ライブラリーの変性と希釈の前に、試薬カートリッジの融解を始めます。手順については、『MiniSeq System Guide』（文書番号：1000000002695）を参照してください。

消耗品および機器

消耗品

以下の消耗品は、ライブラリーの変性と希釈、PhiX コントロールの調製に必要です。

消耗品	サプライヤー
HT1 (プロトコール C) Low TE	MiniSeq キットの構成品 イルミナ、AmpliSeq Library PLUS キットに同梱
ユーザーが用意する消耗品	サプライヤー
1 N NaOH、分子生物学用グレード	一般的なラボ用品サプライヤー
200 mM Tris-HCl, pH 7.0	一般的なラボ用品サプライヤー

以下の追加の消耗品は、PhiX コントロールの調製に必要です。

消耗品	キット名
PhiX、10 nM RSB (Resuspension Buffer)	イルミナ、カタログ番号：FC-110-3002

機器

以下の機器は、ビーズベース法を利用してノーマライズされているライブラリーの変性に使用します。

機器	サプライヤー
Hybex Microsample Incubator	SciGene、カタログ番号：1057-30-0 (115 V) または同等品 SciGene、カタログ番号：1057-30-2 (230 V) または同等品
1.5 mL マイクロチューブ用の ヒートブロック	SciGene、カタログ番号：1057-34-0 または同等品

プロトコール A：標準的なノーマライゼーション法

ライブラリー調製の文書で推奨されている標準的なライブラリー定量手順と品質管理手順を使用してノーマライズされているライブラリーは、プロトコール A を使用して変性および希釈します。

試薬の調製

NaOH の希釈（用事調製）

1. マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。
 - ラボラトリーグレード水（900 μ L）
 - ストック 1.0 N NaOH（100 μ L）総体積が 1 mL の 0.1 N NaOH になります。
2. チューブを数回転倒混和します。

i | 新しい希釈液は **12 時間**以内に使用してください。

HT1 の準備

1. ハイブリダイゼーションバッファのチューブを -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
2. 融解したら、変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、 2°C ~ 8°C で保管します。
3. 使用前に軽くボルテックスしてください。

RSB の準備

i | RSB の代わりに、10 mM Tris-HCl, pH 8.5 with 0.1% Tween 20 を使用できます。

1. RSB のチューブを -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
2. 融解したら、ライブラリーを希釈する準備ができるまで、 2°C ~ 8°C で保管します。

ノーマライズされたライブラリープールの調製

ライブラリーのノーマライズとプーリングが未実施の場合、以下の手順に従って、ライブラリーを 10 nM の濃度にノーマライズした後に、プーリングしてください。ライブラリーを MiniSeq フローセルにロードするには、ライブラリーを単一のプールに混合する必要があります。

ライブラリーが既にノーマライズおよびプーリングされている場合、「ライブラリーを 1 nM に希釈」の手順に進みます。

10 nM にノーマライズされた各ライブラリーの調製

1. 各ライブラリー 10 μ L を新しい MIDI または PCR プレートの対応するウェルに移します。
2. ライブラリー調製ガイドで推奨されている定量方法によって決定される濃度に基づき、以下の式を使用して各ライブラリーを RSB により 10 nM に希釈します。

$$x \mu l = \frac{(10 \mu l)(y \text{ nM})}{10 \text{ nM}} - 10 \mu l$$

この式において、y は個別のライブラリーの濃度を表し、x は RSB の体積を表します。

i | 個別のライブラリーが 10 nM 未満の場合、1 nM の濃度までノーマライズします。

3. 穏やかにピペティングして混合します。
各ライブラリーの濃度に応じて、最終的な体積は 10 μ L ~ 400 μ L の間で異なる場合があります。

10 nM ライブラリープールの調製

1. 10 μ L の各 10 nM ライブラリーを新しいマイクロチューブに添加します。
10 nM ライブラリープールの最終的な体積は、プーリングされるライブラリーの数によって異なります。
2. (オプション) 残りの 10 nM ライブラリーを -25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C で保管します。

ライブラリーを 1 nM に希釈

1. ライブラリー濃度に基づいて、新しいマイクロチューブにライブラリーを移し、RSB を添加します。

ライブラリープール濃度	ライブラリー体積	RSB 体積
10 nM	10 μ L	90 μ L
4 nM	25 μ L	75 μ L
2 nM	50 μ L	50 μ L

2. 軽くボルテックスして、280 \times g で 1 分間遠心します。

ライブラリーの変性

1. マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。
 - 1 nM ライブラリー (5 μ L)
 - 0.1 N NaOH (5 μ L)
2. 軽くボルテックスして、280 \times g で 1 分間遠心します。
3. 室温で 5 分間インキュベートします。
4. 5 μ L の 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 を添加します。

5. 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。

i | 通常、ハイブリダイゼーションバッファーで希釈した後の最終溶液に含まれる NaOH は、1 mM 以下である必要があります。ただし、200 mM Tris-HCl を添加すると、最終溶液内の NaOH が完全に加水分解されます。その結果、最終的な NaOH 濃度が 1 mM を超えても、テンプレートのハイブリダイゼーションは影響を受けません。

ライブラリーをローディング濃度に希釈

- 変性済みライブラリーのチューブに、985 μ L の事前冷却済みハイブリダイゼーションバッファーを添加します。
総体積は、5 pM で 1 mL となります。
- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
- 以下の体積を使用して、目的の濃度に希釈します。

	標準キット	Rapid キット
最終濃度	1.4 pM	1.6 pM
5 pM の変性済みライブラリープール	140 μ L	160 μ L
事前冷却済み HT1	360 μ L	340 μ L

- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
- PhiX コントロールを添加する場合は、5 ページの「ライブラリーをローディング濃度に希釈」に進みます。そうでない場合は、12 ページの「次の手順」を参照してください。

プロトコール B：ビーズベースのノーマライゼーション法

ライブラリー調製の文書に記載されているビーズベースのノーマライゼーションをサポートする方法に示された、ビーズベースの手順を用いてノーマライズされ、プーリングされているライブラリーを変性および希釈するには、プロトコール B を使用します。

ビーズベースのノーマライゼーション手順は、場合によって異なる可能性があります。ライブラリーのタイプおよび過去のシーケンスにおける経験に応じて、2 ~ 5 μ L のライブラリーで最適な結果が得られます。

HT1 の準備

- ハイブリダイゼーションバッファーのチューブを -25 °C ~ -15 °C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
- 融解したら、変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、2 °C ~ 8 °C で保管します。
- 使用前に軽くボルテックスしてください。

インキュベーターの準備

1. インキュベーターを 98 °C に予熱します。

ライブラリーをローディング濃度に希釈

1. マイクロチューブに、以下の体積のプーリング済みライブラリーと事前冷却済みハイブリダイゼーションバッファーを混ぜ合わせます。

プーリング済みライブラリー	事前冷却済みハイブリダイゼーションバッファー
2 µL	998 µL
3 µL	997 µL
4 µL	996 µL
5 µL	995 µL

総体積は 1 mL となります。

2. 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
3. 250 µL の希釈済みライブラリーを新しいマイクロチューブに移します。
4. 250 µL の事前冷却済みハイブリダイゼーションバッファーを添加します。
5. 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。

希釈済みライブラリーの変性

1. チューブを予熱済みのインキュベーターに 2 分間置きます。
2. すぐに氷上で冷却します。
3. 氷上に 5 分間置きます。
4. PhiX コントロールを添加する場合は、[11 ページの「PhiX コントロールの変性と希釈」](#)に進みます。そうでない場合は、[12 ページの「次の手順」](#)を参照してください。

プロトコール C : AmpliSeq for Illumina パネルのノーマライゼーション法

標準的な AmpliSeq for Illumina ワークフローを用いて調製されたライブラリーを変性および希釈する場合は、プロトコール C を使用します。最終的なローディング濃度と体積は、ライブラリー調製方法と定量方法によって異なります。シーケンスランごとにサポートされるライブラリー数の詳細については、[イルミナのサポートウェブサイト](#)にアクセスし、使用するパネルの AmpliSeq for Illumina サポートページを参照してください。

試薬の調製

NaOH の希釈（用事調製）

1. マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。
 - ラボラトリーグレード水（800 μ L）
 - ストック 1.0 N NaOH（200 μ L）
 1 mL の 0.2 N NaOH が得られます。
2. チューブを数回転倒混和します。

i | 新しい希釈液は **12 時間**以内に使用してください。

HT1 の準備

1. HT1 を $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ の保管場所から取り出し、室温で融解します。
2. 変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管します。

Low TE の準備

1. Low TE を $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ の保管場所から取り出し、室温で融解します。
2. ライブラリーを希釈する準備ができるまで、融解した Low TE を室温で保管します。

ライブラリーの希釈

1. 新しい 96 ウェル LoBind PCR プレートで、Low TE を使用して各ライブラリーを 2 nM に希釈します。

ライブラリーのプーリング

1. 各 2 nM ライブラリーを同じ体積だけプレートから 1.5 mL LoBind チューブに移します。
DNA ライブラリーおよび RNA ライブラリーがある場合には、それぞれに別々のチューブを必ず使用してください。
2. 各チューブをボルテックスして混合します。
3. 各チューブを短時間遠心します。
4. DNA ライブラリーと RNA ライブラリーを 1 つのシーケンスランにグループ化する場合は、DNA ライブラリープールと RNA ライブラリープールを次の比率で混合します。

パネル	DNA と RNA の比率
AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel	8:1
AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Panel	5:1
AmpliSeq for Illumina Focus Panel	7:3
AmpliSeq for Illumina Comprehensive Panel v3	25:1

5. プールを混合してから、チューブをボルテックスして混合した後、短時間遠心します。

ライブラリーの変性

1. マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。

試薬	体積 (μL)
プーリング済みライブラリー	10
0.2 N NaOH	10

2. 軽くボルテックスした後、短時間遠心します。
3. 室温で5分間インキュベートします。
4. 2 nM プーリング済みライブラリーを含むチューブに、10 μL の 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 を添加します。
5. 軽くボルテックスした後、短時間遠心します。

20 pM への変性済みライブラリーの希釈

1. 2 nM 変性済みライブラリープールのチューブに、970 μL の事前冷却済み HT1 を添加します。
20 pM 変性済みライブラリーが得られます。
2. 軽くボルテックスした後、短時間遠心します。
3. 最終希釈に進む準備ができるまで、20 pM ライブラリーを氷上に置きます。

最終ローディング濃度へのライブラリーの希釈

1. 事前冷却済み HT1 を使用して、変性済み 20 pM ライブラリー溶液を最終体積 500 μL で 1.1 ~ 1.9 pM に希釈します。
2. 転倒混和した後、短時間遠心します。

安全なストップポイント

中断する場合は、プレートを密閉し、-25 °C ~ -15 °C で保管します。

プロトコール D : AmpliSeq Library Equalizer for Illumina のノーマライゼーション法

AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを用いて調製されたライブラリーを変性および希釈する場合は、プロトコール D を使用します。AmpliSeq Library Equalizer for Illumina ワークフローを用いて調製されたライブラリーは、サンプルプーリングに適した開始濃度にノーマライズされています。シーケンスランごとにサポートされるライブラリー数の詳細については、[イルミナのサポートウェブサイト](#)にアクセスし、使用するパネルの AmpliSeq for Illumina サポートページを参照してください。

試薬の調製

NaOH の希釈（用事調製）

1. マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。
 - ラボラトリーグレード水（800 μ L）
 - ストック 1.0 N NaOH（200 μ L）1 mL の 0.2 N NaOH が得られます。
2. チューブを数回転倒混和します。

i | 新しい希釈液は **12 時間**以内に使用してください。

HT1 の準備

1. HT1 を -25°C ~ -15°C の保管場所から取り出し、室温で融解します。
2. 変性済みライブラリーを希釈する準備ができるまで、 2°C ~ 8°C で保管します。

ライブラリーのプーリング

1. 各ライブラリーを同じ体積だけプレートから 1.5 mL LoBind チューブに移します。
DNA ライブラリーおよび RNA ライブラリーがある場合には、それぞれに別々のチューブを必ず使用してください。
2. 各チューブをボルテックスして混合します。
3. 各チューブを短時間遠心します。

4. DNA ライブラリーと RNA ライブラリーを 1 つのシーケンスランにグループ化する場合は、DNA ライブラリープールと RNA ライブラリープールを次の比率で混合します。

パネル	DNA と RNA の比率
AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel	8:1
AmpliSeq for Illumina Childhood Cancer Panel	5:1
AmpliSeq for Illumina Focus Panel	7:3
AmpliSeq for Illumina Comprehensive Panel v3	25:1

5. プールを混合してから、チューブをボルテックスして混合した後、短時間遠心します。

ライブラリーの変性

1. マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。

試薬	体積 (μL)
プーリング済みライブラリー	10
0.2 N NaOH	10

- 軽くボルテックスした後、短時間遠心します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。
- プーリング済みライブラリーを含むチューブに、10 μL の 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 を添加します。
- 軽くボルテックスした後、短時間遠心します。

変性済みライブラリーの希釈

- 変性済みライブラリープールのチューブに、970 μL の事前冷却済み HT1 を添加します。
- 軽くボルテックスした後、短時間遠心します。
- 最終希釈に進む準備ができるまで、ライブラリーを氷上に置きます。

最終ローディング濃度へのライブラリーの希釈

- 以下の体積を混合して、変性済みライブラリー溶液を最終ローディング濃度に希釈します。
 - 変性済みライブラリー (28 μL)
 - HT1 (472 μL)
- 転倒混和した後、短時間遠心します。

安全なストップポイント

中断する場合は、プレートを密閉し、-25 °C ~ -15 °C で保管します。

PhiX コントロールの変性と希釈

4 nM への PhiX の希釈

- 10 nM PhiX ストックのチューブを融解します。
- マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。
 - 10 nM PhiX (10 μ L)
 - RSB (15 μ L)
 総体積は、4 nM で 25 μ L となります。
- 軽くボルテックスした後、パルス遠心します。

i | (オプション) 4 nM PhiX を -25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C で最長 3 か月保管できます。

PhiX の変性

- マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。
 - 4 nM PhiX (5 μ L)
 - 0.1 N NaOH (5 μ L)
- 軽くボルテックスした後、パルス遠心します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。
- 5 μ L の 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 を添加します。
- 軽くボルテックスして、280 \times g で 1 分間遠心します。

変性済み PhiX のローディング濃度への希釈

- 変性済み PhiX ライブラリーのチューブに、985 μ L の事前冷却済みハイブリダイゼーションバッファを添加します。
総体積は、20 pM で 1 mL となります。
- 軽くボルテックスして、280 \times g で 1 分間遠心します。
- 以下の体積を使用して、目的の濃度に希釈します。

	標準キット	Rapid キット
最終濃度	1.4 pM	1.6 pM
20 pM 変性済み PhiX	35 μ L	40 μ L
事前冷却済み HT1	465 μ L	460 μ L

- 軽くボルテックスして、280 \times g で 1 分間遠心します。
- ライブラリーを試薬カートリッジにロードする準備ができるまで、氷上に置いておきます。

i | (オプション) 変性済みの PhiX を -25 $^{\circ}$ C ~ -15 $^{\circ}$ C で最長 2 週間保管できます。2 週間経過すると、クラスター数が減少する傾向があります。

ライブラリーと PhiX コントロールの混合

ほとんどのライブラリーでは、シーケンスコントロールとして 1% の低濃度 PhiX コントロール添加を使用します。多様性の低いライブラリーでは、PhiX コントロール添加を少なくとも 5% に増やします。

1. 等濃度の変性済み PhiX コントロールと変性済みライブラリーを以下の体積で混ぜ合わせます。

	ほとんどの ライブラリー (1% の添加)	多様性の 低いライブラリー (10% 以上の添加)
変性および希釈済みの PhiX	5 μ L	50 μ L
変性および希釈済みのライブラリー (プロトコール A、B、C、または D によるもの)	495 μ L	450 μ L

2. 試薬カートリッジにロードする準備ができるまで、氷上に置いておきます。

i | 実際の PhiX の割合はライブラリープールのクオリティと量により異なります。

次の手順

ライブラリーを変性および希釈し、オプションで PhiX コントロールを調製したら、ライブラリーを融解した試薬カートリッジにロードし、シーケンスランをセットアップする準備が整います。詳細な手順については、『MiniSeq System Guide』（文書番号：1000000002695）を参照してください。

文書、ソフトウェアダウンロード、よくある質問、およびオンライントレーニングについては、イルミナのサポートウェブサイトの [MiniSeq サポートページ](#) を参照してください。

トラブルシューティングラン用の PhiX の調製

以下の手順に従って、PhiX のみのシーケンスランとして使用するために PhiX ライブラリーを変性および希釈します。PhiX のみでのランの実行は、装置性能の確認やトラブルシューティングの目的で役に立ちます。PhiX のみのランでは、推奨される体積およびローディング濃度の 100% PhiX ライブラリーが必要です。

先に進む前に、[3 ページの「試薬の調製」](#) の説明に従って試薬を調製します。

4 nM への PhiX の希釈

1. 10 nM PhiX ストックのチューブを融解します。
2. マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。

- 10 nM PhiX (10 μ L)
- RSB (15 μ L)

総体積は、4 nM で 25 μ L となります。

- 軽くボルテックスした後、パルス遠心します。

i | (オプション) 4 nM PhiX を -25 °C ~ -15 °C で最長 3 か月保管できます。

PhiX の変性

- マイクロチューブに以下の体積を混ぜ合わせます。
 - 4 nM PhiX (5 µL)
 - 0.1 N NaOH (5 µL)
- 軽くボルテックスした後、パルス遠心します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。
- 5 µL の 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 を添加します。
- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。

変性済み PhiX ライブラリーのローディング濃度への希釈

- 変性済み PhiX ライブラリーのチューブに、985 µL の事前冷却済みハイブリダイゼーションバッファを添加します。
総体積は、20 pM で 1 mL となります。
- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
- 以下の体積を使用して、目的の濃度に希釈します。

	標準キット	Rapid キット
最終濃度	1.4 pM	1.6 pM
20 pM 変性済み PhiX	35 µL	40 µL
事前冷却済み HT1	465 µL	460 µL

- 軽くボルテックスして、280 × g で 1 分間遠心します。
- ライブラリーを試薬カートリッジにロードする準備ができるまで、氷上に置いておきます。



イルミナ株式会社
東京都港区芝 5-36-7
三田ベルジュビル 22 階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
techsupport@illumina.com
jp.illumina.com

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。
© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®